

<p><b>96-306444/31</b> B04 D21          KYODO NYUGYO KK          94.11.04 94JP-293679 (96.05.28) A61K 7/48, 7/00, 38/22, 38/27  <b>Fair skin agent which improves rough skin - contains e.g. whey fraction of milk containing e.g. insulin like growth factor</b>  <b>C96-097562</b></p>	<p><b>KYOD 94.11.04</b>          *JP 08133943-A</p>	<p>Agent comprises whey fraction of colostrum of ruminants or whey fraction of milk derived from animals with single stomach which contains insulin like growth factor, transformation growth factor and fibroblast growth factor. Also claimed is the agent comprising cream fraction, film fraction of milk fat granule and butter milk fraction of ruminants or non-ruminants which contains fibroblast growth factor and heparin sulphate proteoglycan.</p> <p><u>USE</u>          The agent improves rough skin, and has anti-allergic activity.</p> <p>In an example, human milk obtd. from the mother of a 2 week old baby was separated into cream and skim milk by centrifuging. Butter milk fraction was obtd. from cream, and casein was eliminated by adjusting pH at 4.6 or ethanol precipitation method. The fraction was desalted by ultrafiltration of fraction molecular wt. 3,000 or dialysis,</p>	<p>B(4-B4K, 4-H6, 14-G2A, 14-N17C, 14-R1) D(8-B9A)          .5</p> <p>and freeze-dried to give human butter milk derived FGF (HBM-FGF). On the other hand, CaCl<sub>2</sub> and ethanol were added to the skim milk, heated at 40 deg.C, and beta-lactoglobulin in the supernatant was immobilized using retinoic acid aminoculofine resin (RA-cerulofine). RA-cerulofine non-absorbed substance was desalted and freeze-dried to give human skim milk derived growth factor (BCSM-GFs). The backs (5 mm<sup>2</sup>) of mice (4 days old and 16 week old) were applied with xylene to make rough skin, and 16 hrs. later, gaze soaked with beauty soln. (500 ml) contg. BCSM-GFs 1% was applied on the rough backs of the mice, and kept for 48 hrs. under the same conditions. As a control, the commercially available beauty soln. was applied. The skin condition of the sample improved, whereas that of the control did not improve.          (4ppDwgNo.0/2)</p>
--	---	--	---

JP 08133943-A

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-13394

(43) 公開日 平成8年(1996)5月

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	片内整理番号	P I	技術表示
A 6 1 K 7/48				
7/00	K			
38/22	ADA			
			A 6 1 K 37/ 24	ADA
			37/ 36	
			審査請求 未請求 請求項の数3	FD (全 4 頁) 最終頁に

(21) 出願番号 特願平6-293679

(22) 出願日 平成6年(1994)11月4日

(71) 出願人 000162412

協同乳業株式会社

東京都中央区日本橋小網町17番2号

(72) 発明者 大石 一二三

東京都立川市西砂町3-15-24

(72) 発明者 谷 久典

東京都福生市本町31-2-203

(72) 発明者 服部 隆史

東京都小平市上水本町5-1-19-20X

(74) 代理人 弁理士 石山 博 (外1名)

(54) 【発明の名称】 美肌剤

(57) 【要約】

【目的】 ヒト及びウシなどの単胃及び反芻動物の乳汁から各増殖因子を含む画分を得、それぞれの細胞及び皮膚に対する美肌効果を発揮する美肌剤に関する。

【構成】 インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を含む反芻動物初乳又は単胃動物乳のホエー画分を有効成分とし、若しくは線維芽細胞増殖因子、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む反芻又は単胃動物乳のクリーム画分、乳脂肪球皮膜及びバターミルク画分を有効成分とする美肌剤。

(2)

特開平8-1339

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を含む反芻動物初乳の水エー画分を有効成分とすることを特徴とする美肌剤。

【請求項2】 インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を含む単胃動物乳の水エー画分を有効成分とすることを特徴とする美肌剤。

【請求項3】 線維芽細胞増殖因子、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む反芻又は単胃動物乳のクリーム画分、乳脂肪球皮膜及びバターミルク画分を有効成分とする 10

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、ヒト及びウシなどの単胃及び反芻動物の乳汁から各増殖因子を含む画分を得、それぞれの細胞及び皮膚に対する美肌効果を発揮する美肌剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】哺乳動物の乳汁には種々の増殖因子が含まれており、それぞれ種の新生児の健全な発育に必須である。たとえば、もつともよく研究されているヒトやウシでは、ヒトとウシ乳に共通して認められる増殖因子は、IGF（インスリン様増殖因子、Francis, G.L. et al., Biochem. J., 251, 95-103(1988)、Rinderknecht, E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 2365-2369(1976)）、TGF（形質転換増殖因子、Noda, K. et al., Gann, 75, 109-112(1984)、David, Y. J. et al., J. Protein Chemistry, 10, 565-575(1991)）、及び aFGF と bFGF（酸性と塩基性線維芽増殖因子、発明者ら未発表）であり、EGF（上皮細胞増殖因子）はヒト乳にのみ認められ、ウシ乳には存在しない（Shing, Y. W. et al., Endocrinology, 115, 273-282(1984)）と報告されている。

【0003】これら各増殖因子の細胞特異性は極めて低く、広範囲の細胞に作用する。その作用範囲は増殖ばかりではなく、たとえばTGF- $\beta$ はマクロファージを不活性化することによる免疫抑制（Tsunawa K, S. et al., Nature, 334, 260-262, (1988)）や結合組織、細胞外基質の主要成分であるコラーゲンファイブロンネクチンやプロテオグリカンの合成を促進させる（Kovacs, E. J. et al., Immunol. Today 12, 17(1991)、Kelley, J., Am. Rev. 40

と同一であり、異種間の細胞にも同様に作用する。この見地から発明者らはヒト及びウシ乳汁から各因子を含む画分を得、それぞれの細胞及び皮膚に対する効果を調べ、美肌効果が非常に高いことを見出し、明を完成した。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】すなわち、この発明は、請求項1に記載の美肌剤は、インスリン様因子、形質転換増殖因子及び線維芽細胞増殖因子を反芻動物初乳の水エー画分を有効成分とする。また2に記載の美肌剤は、インスリン様増殖因子、形増殖因子及び線維芽細胞因子を含む単胃動物乳の画分を有効成分とする。更に請求項3に記載の美は、線維芽細胞増殖因子、ヘパラン硫酸プロテオンを含む反芻又は単胃動物乳のクリーム画分、乳皮膜及びバターミルク画分を有効成分とする。

## 【0007】

【作用】インスリン様増殖因子、形質転換増殖因子線維芽細胞増殖因子を含む反芻動物初乳又は単胃の水エー画分を有効成分とし、若しくは線維芽細胞因子、ヘパラン硫酸プロテオグリカンを含む反芻動物乳のクリーム画分、乳脂肪球皮膜及びバターク画分を有効成分として美肌剤を製造する。

## 【0008】

【実施例】次に実施例でこの発明を詳細に説明す例1. ヒト乳からの調製法：分娩後2週間までの心分能により、クリームと脱脂乳に分けた。クリームからチヤーン法により脱脂乳を除去し、バター画分を得、pH4.5又はエタノール沈殿法により脱タンした。分画分子重3,000の限外濾過モジュール、透析膜で脱塩した後、凍結乾燥した。これをHuman milk derived FGF(HBM-FGF)とし、実験に供し脂乳は最終カルシウム濃度とエタノールを0.05～10～20%になるようにCaCl<sub>2</sub>とエタノールを加え、0%に調整した後、40℃に加熱した。生じた沈殿物を分能で除去し、上清液をレチノイン酸固定化アミロフアイン樹脂(RA-セルロフアイン、生化学工業に接触させ、 $\beta$ -ラクトグロブリンを除去した。Fロフアイン樹脂非吸着物を分画分子重3,000の限外モジュール（旭化成社製）を用いて脱塩した後、

(3)

特開平8-1336

3

4

QFsとBCSM-QFsはマウスBALB/C 3T3細胞を用い、それらの細胞数をカウントすることで活性を測定した。

【0011】a) HBM-FGFとBCBM-FGF:細胞増殖活性はウシ臍帯から酵素法(三井洋司ら編、機能細胞の分離と培養(1987), 227-229)で内皮細胞を得、10%FCS加RPMI 1640培地(ギブコ社製)で37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で3代予備培養した。96穴マイクロプレート(ファルコン社製)に50個/穴の細胞数になるように植え付け、無血清培地(RPMI 1640)に置換した後、HBM-FGFとBCBM-FGFを0-3%濃度になるように加え、48時間〜72時間培養し、各穴の細胞数をカウントした。結果を図1に示した。

【0012】b) HSM-QFsとBCSM-QFs:細胞増殖活性はMEW培地(ギブコ社製)にて、上記条件下で予備培養した3T3細胞を96穴マイクロプレートに(a)に記した条件で植え付け、HSM-FGsとBCSM-QFsを0-3%濃度になるように加

\*え、同一条件下で培養し、各穴の細胞数をカウントした。図2に結果を示した。

【0013】細胞外基質合成能はコラーゲン、ヒン酸(HA)及びヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)含量を測定した。つまり3T3細胞直径80mmのデツミアルコン社製)に植え付け、無血清RPMI 1640培地QFsとBCSM-QFsをそれぞれ0-3%濃度になるように(a)に記載の条件下で細胞数がコンフルエントになるまで培養した細胞をEDTAを用いて剥離し、デツシユしている細胞外基質を得た。コラーゲンは電気泳で、HAとHSPGはニトロセルロース膜二次元電気泳測定した。結果を表1に示す。

【0014】

【表1】

	HSM-QFs 添加(%)				BCSM-QFs 添加(%)			
	0	1	2	3	0	1	2	3
コラーゲン	-	±	++	+++	-	+	++	+++
HA	-	±	+	++	-	+	+	++
HSPG	-	-	+	+	-	+	+	+

- : 陰性    ± : 疑陽性    +, ++, +++ : 陽性(活性の強さをあらわす)

【0015】例4. 肌荒れ改善効果: 23°C、50%湿度で飼育している生後4日目のマウスと16週令のマウスの背部5mm<sup>2</sup>にキシレンを塗布し、肌を荒れさせた。16時間後にBCSM-QFs 1%加市販美容液500mlを染み込ませたガーゼを塗布し、48時間同一条件下で飼育した。対照として、同一固体の背部5mm<sup>2</sup>にキシレンを塗布し、同一条件下で市販美容液を同量塗布し、同一条件下で48時間飼育した。判定は皮膚の状態を肉眼的に観察して行なった。結果を表2に示す。

【0016】

【表2】

肌荒れ改善効果	
対照(美容液のみ)	-

【0017】例5. アレルギー改善効果と抗アレルギー作用: 金属接触性皮膚アレルギー疾患のボランティア左腕に金属を接触させ、炎症を誘発させた。そのに用いたものと同じBCSM-QFs添加及び無添加美容液を塗布し、その改善効果を肉眼的に観察した。また炎症発する直前に同じ美容液を塗布し、金属を接触させた炎症反応を肉眼的に観察した。結果を表3に

【0018】

【表3】

(4)

特開平8-1339

5

6

	治療効果	予防効果
対照（美容液のみ）	-	-
BCSM-GFs 1%添加美容液	+	+

- : 効果なし + : 効果あり

【0019】

【発明の効果】この発明による美容剤によつて、肌荒れの改善効果と共に抗アレルギー作用が得られた。

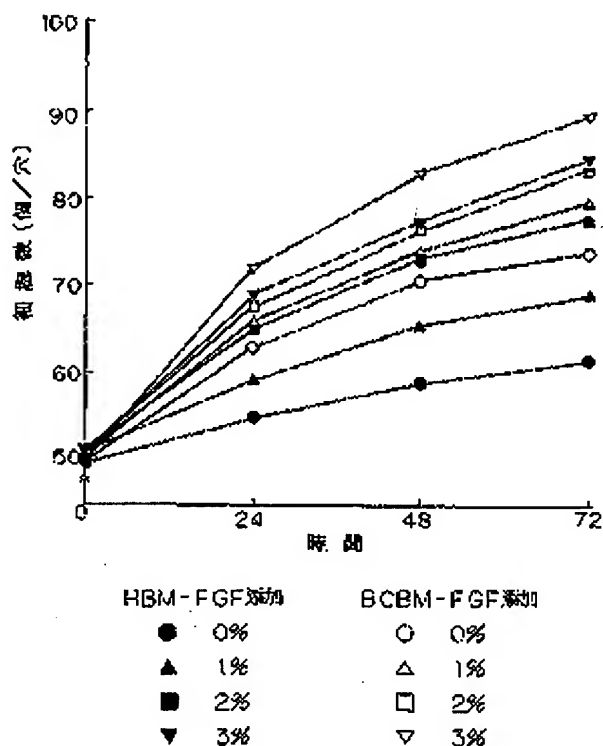
【図面の簡単な説明】

【図1】ウシ初乳にHBM-FGF又はBCBM-FGFを添加した各 \*

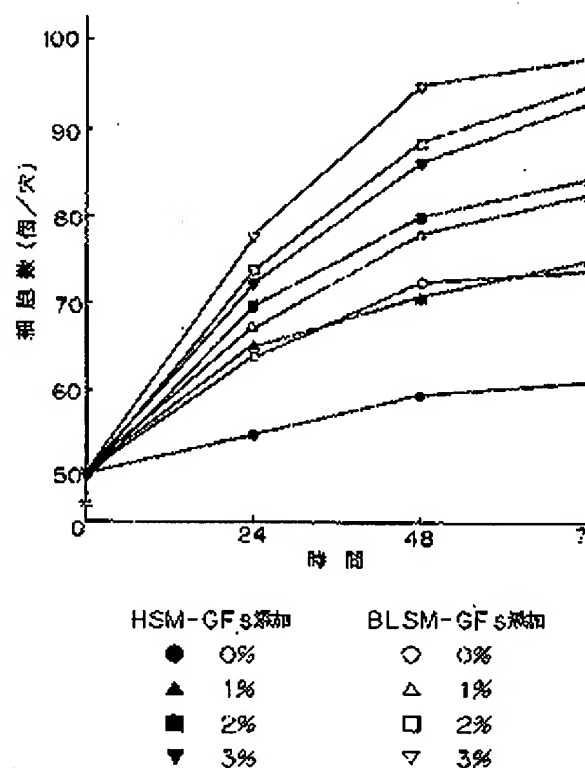
\*調整物の細胞増殖活性を時間と細胞数の関係で示  
ある。

【図2】ウシ初乳にHSM-GFs又はBLSM-GFsを添加し  
調整物の細胞増殖活性を、時間と細胞数との関係  
図である。

【図1】



【図2】



<p>96-283416/29 B04 KYODO NYUGYO KK 94.10.25 94JP-283944 (96.05.14) A61K 35/20, 38/22, C07K 14/50 Milk derived fibroblast growth factor obtd. from cream fraction of mammalian milk - used for growth stimulation of fibroblast and nerve and epithelial cells C96-090242</p>	<p>B(4-H6G) .I  detected. (3pp079DwgNo.0/1)</p>
<p>Milk derived fibroblast growth factors (FGFs) have an isoelectric point at acidic pH 5-6, basic pH 8-10, or high affinity to heparin of heparan sulphate.</p> <p>Bovine colostrum (BC) within 24 hrs. is pref. centrifuged to give creamy fraction. The fraction is dispersed in Tris-CH1 buffer and centrifuged 3 times and lyophilised. In one vol. of dried cream, 5 vol. acetone is mixed and pptes. were collected by centrifugation. The process is repeated 3 times to give acetone powder. The acetone powder is dissolved in a buffer, and purified to FGF antibody contg. acidic FGF (aFGF) and basic FGF (bFGF).</p> <p>In an example the fraction was charged to heparin-"Sepharese" (RTM) column and conc. gradiently eluted with NaCL aq. soln. upto 2.0 M and several micro-g of aFGF and 20-30 micro-g of bFGF were</p>	<p>JP 08119867-A</p>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-119867

(43) 公開日 平成8年(1996)5月14日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	P I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/20	ADS	7431-4C		
38/22				
C 0 7 K 14/50		8318-4H		
			A 6 1 K 37/ 24	
			審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 3 頁)	

(21) 出願番号 特願平6-283944

(22) 出願日 平成6年(1994)10月25日

(71) 出願人 000162412

協同乳業株式会社

東京都中央区日本橋小網町17番2号

(72) 発明者 大石 一二三

東京都立川市西砂町3-15-24

(72) 発明者 谷 久典

東京都福生市本町31-2-203

(74) 代理人 弁理士 石山 博 (外1名)

(54) 【発明の名称】 乳由来線維芽細胞増殖因子

(57) 【要約】

【目的】 入手可能な哺乳類の乳汁由来新規線維芽細胞増殖因子に関する。

【構成】 等電点が5～6の酸性側にあり、等電点が8～10の塩基性側にあり、又はヘパリン又はヘパラン硫酸に対して強い親和性を有する乳由来線維芽細胞増殖因子。

(2)

特開平8-119867

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 等電点が5～6の酸性側にあることを特徴とする乳由来線維芽細胞増殖因子。

【請求項2】 等電点が8～10の塩基性側にあることを特徴とする乳由来線維芽細胞増殖因子。

【請求項3】 ヘパリン又はヘパラン硫酸に対して強い親和性を有することを特徴とする乳由来線維芽細胞増殖因子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、入手可能な哺乳類の乳汁由来新規線維芽細胞増殖因子に関するものである。

【0002】

【従来の技術】線維芽細胞増殖因子（FGF）は、マウス線維芽細胞の増殖を促進する因子として、牛の脳及び下垂体から単離された。当初、線維芽細胞に特異的に作用すると考えられていたが、現在では間葉系細胞、神経細胞、上皮細胞などに広く作用し、特に血管内皮細胞に強い活性を有することが明らかにされている。なおFGFは等電点（pI）が5～6の酸性FGF（aFGF）とpIが9～10の塩基性（bFGF）に区別されている。

【0003】aFGF、bFGFとともに、視床下部、脳、網膜、眼、腎、心筋、肝細胞（再生時）、前立腺、胎盤、軟骨、脾、内皮細胞、線維芽細胞、脳線、マクロファージなど生体内各組織や細胞で広く産生、分布しているが、乳腺細胞や乳汁中での存在は報告されていない。しかし、哺乳類の乳はそれぞれの種の新生子にとって唯一の完全食であり、それらの中には発育に不可欠な種々の栄養成分の他にも、インスリン様増殖因子（Francis, G. L. et al, Biochem. J., 251, 95-103, (1988)), 上皮細胞増殖因子（Shin, Y. W. et al, Endocrinology, 115, 273-282 (1984)), 形質転換増殖因子（Noda, K. et al, Gann, 75, 109-112 (1984), Tokuyama, H., et al, Growth Factors, 3, 105-114 (1990))など、種々の活性を有する増殖因子を特に初乳中に多く含有している。

【0004】そこで発明者らは、多様な機能を有するFGFも当然含有されていると考え、FGFの特徴であるヘパリンやヘパラン硫酸（HS）親和性に着目し、この発明を完成した。すなわち、乳脂肪球皮膜（MFGM）には、HSプロテオグリカンの存在が明らかにされている（Shimizu, M., et al, Agric. Biol. Chem., 45, 741-745 (1981)）。一般的にFGFは生体内各細胞で産生された後、細胞膜や基底膜に存在するHSプロテオグリカンと結合し、貯蔵、安定化されている（Folkman, J. et al, Am. J. Pathol., 130, 393-400 (1988), Gospodarowicz, D. et al, J. Cell Physiol., 128, 475-484 (1986)）。したがって、乳においても乳腺細胞で産生された後、その大部分はMFGMのHSプロテオグリカンに存在することが予測され

2

【発明が解決しようとする課題】既述のように、乳中の増殖因子を検索するにあたり、すべての研究者はホエー蛋白質を中心に行なっていた。発明者らは乳中に存在する新たな増殖因子を検索するにあたり、MFGMを中心に主に免疫検定法を用いて行ない、ウシ初乳（BC）にBC-aFGFとBC-bFGFの存在を見いだした。

【0006】この発明は等電点が5～6の酸性側にあり、等電点が8～10の塩基性側にあり、又はヘパリン又はヘパラン硫酸に対して強い親和性を有する乳由来線維芽細胞増殖因子を提案するものである。

【0007】

【作用】この発明の特徴は、BC-FGF製造の原料として、哺乳類の乳（特に初乳）のクリーム画分を用いることにある。しかし、BC-FGFの一部はホエー中にも存在するため、この画分を用いることもできる。また、乳は入手可能なものであれば、その種類を問わない。

【0008】次に実施例によつてこの発明を詳細に説明する。例1、免疫検定用試料の調製：分岐後24時間までの牛初乳から遠心分離（3000rpm, 20min）によつて得たクリーム画分を、0.15M NaCl加0.1M トリス-塩酸バッファ（pH7.0）に分散させた後、遠心分離した。この操作を3回繰り返してクリーム画分を洗浄した後、凍結乾燥した。乾燥クリーム1容に5容のアセトンを加え、室温下で1時間攪拌した。この操作を3回繰り返し、アセトン不溶物を遠心分離で集め、減圧下で残存アセトンを除き、クリーム画分のアセトンパウダーを作成した。

【0009】アセトンパウダーを2M NaClと6M尿素を含む0.1M トリス-塩酸バッファ（pH7.0）に溶解し、2M NaClと6M尿素を含む同じバッファで平衡化したスーパーデックス75（ファルマシア社製）カラムに負荷し、ゲル濾過した。分画物をFGF抗体を固定化したセンサーチップを用いて、BIAcore（ファルマシア社製）でモニターし、FGF抗体と反応する画分を集め、0.15M NaClを含む20mM トリス-塩酸バッファ（pH7.0）に対して透析した。これをレチノイン酸固定化セルロフアイン（生化学工業社製）カラムと、Cu-キレートセルロフアイン（生化学工業社製）カラムを直接結合したカラムに負荷し、非吸着画分を集め、コンカナバリンA セファロースカラム（ファルマシア社製）に負荷した。

【0010】非吸着画分を直接ヘパリン-セファロース（ファルマシア社製）に負荷し、2.0M NaClまでの直線的濃度勾配法で溶出した。1M NaCl付近と1.5M NaCl付近に溶出される物質を集め、それぞれ陽イオン水に対して透析した後、凍結乾燥した。これを常法に基づいてSDS電気泳動した後、常法に基づいてウエスタンブロットした。染色用に用いた抗体は、aFGF抗体とbFGF抗体（共にシグマ社製）である。また同じ調製物を常法でELISAを行ない、aFGFとbFGFの含量を測定した。aFGFとbFGFは牛

(3)

特開平8-119867

3

の洗浄クリームに最終尿素濃度が6Mになるように固形尿素を加え、pHを7.0に調整した。氷冷下でポリトロンで攪拌(12,000rpm,10min)し、生じたバター塊と不溶物を遠心分離(3,000rpm,15min)で除去した。得た清澄液にNaClを2.0Mになるように加え、例1に記載のスーパーデツクス75(ファルマシア社製)カラムに負荷した。以降例1に記載の方法によりaFGFとbFGFを調製した。また、ヘパリン-セファロースカラムに負荷する前のコンカナバリンAセファロースカラム非吸着画分と、ヘパリン-セファロースカラム1.0M NaCl溶出画分と、1.5M NaCl溶出画分を、それぞれアイソエレクトリックフォーカシング(バイオラッド社製) pH3.5~10の範囲で等電点分離し、それぞれの画分の活性を測定した。ホエーからは、酸-エタノール法で脱カゼインし、得たホエーを7.0に調整した後、例1に記載の方法で調製した。

【0012】活性測定は、牛臍帯由来内皮細胞を5%牛胎児血清加RPMI 1640で5%CO<sub>2</sub>、37℃、48時間予備培養し、血清を含まない同じ培地に交換した後、調製した1.0M NaCl溶出物(BC-aFGF)と、1.5M NaCl溶出物(BC-bFGF)を、0~100ng/ml培地に添加し、さらに同一条件下で72時間培養した。培養後の細胞数をカウントし、活性を測定した。

【0013】結果を図1に示す。この図1に示したよう\*

4

\*に、BC-FGFはpH5~6と8~10に等電点を示す2つに大別される増殖因子を含有している。ヘパリン-セファロースカラムでの1.0M NaCl溶出画分の等電点は5~6であり、1.5M NaClで溶出される画分のそれは8~10であった。これらは内皮細胞に対し非常に強い活性を示すとともに、マウス3T3細胞(線維芽細胞)などにも作用した。

【0014】また分娩後1~2週間以内のヒト乳にもFGFは認められることから、FGFは哺乳動物、反芻動物を問わずそれらの初乳中に分布していた。さらに、分娩後16時間以内のウシやヒト初乳から分離培養した乳腺細胞を、それぞれbFGF抗体で細胞染色するとともに、それぞれの培養培地を部分精製し、常法でウェスタンブロッティングすると、それぞれの抗体に対し、明瞭な陽性反応を示した。このことから、ウシやヒト乳中に存在するFGFは乳腺細胞で産生されたものであることを確認した。

【0015】

【発明の効果】この発明によれば、入手可能な哺乳動物の乳のクリーム画分を用いて、容易に乳汁由来新規線維芽細胞増殖因子を産生できるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】各種の条件下におけるウシ初乳の等電点を示す図である。

【図1】

